

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Januar 2005 (06.01.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/001072 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 5/06,
A61K 35/39

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/003810

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. April 2004 (08.04.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 28 280.7 23. Juni 2003 (23.06.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus-
nahme von US): **FRAUNHOFER GESELLSCHAFT**

ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG e. V. [DE/DE]; Hansastrasse 27c,
80686 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRUSE, Charli**
[DE/DE]; Peermoor 33, 23923 Herrnburg (DE).

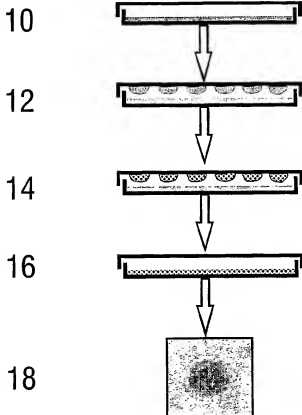
(74) Anwalt: **HERTZ, Oliver**; v. Bezold & Sozien,
Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ISOLATED PLURIPOTENT ADULT STEM CELLS AND METHODS FOR ISOLATING AND CULTIVATING THE
SAME

(54) Bezeichnung: ISOLIERTE ADULTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN UND VERFAHREN ZU DEREN ISOLIERUNG
UND KULTIVIERUNG



(57) Abstract: The invention relates to isolated pluripotent adult stem cells obtained from exocrine glandular tissue, and to methods for isolating and cultivating said pluripotent stem cells.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft isolierte pluripotente adulte Stammzellen, welche aus exokrinem Drüsengewebe erhalten wurden, sowie Verfahren zur Isolierung und Kultivierung dieser pluripotenten Stammzellen.



KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Isolierte adulte pluripotente Stammzellen und Verfahren
zu deren Isolierung und Kultivierung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft adulte pluripotente Stammzellen und Verfahren zu deren Isolierung und Kultivierung.

Hintergrund der Erfindung

10

Als Stammzellen werden solche Zellen bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, sich unbegrenzt zu teilen und sich unter geeigneten Umständen bzw. durch geeignete Stimuli in verschiedene Zellarten differenzieren zu können. Stammzellen besitzen das Potenzial, sich in Zellen mit charakteristischer Gestalt und spezialisierten Funktionen zu entwickeln.

15

Aufgrund ihrer unterschiedlich ausgeprägten Potenz, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, unterscheidet man bisher embryonale von adulten Stammzellen. Es besteht die allgemeine Ansicht, dass mit der Entwicklung von der befruchteten Eizelle über das embryonale Stadium bis zum adulten Organismus die Potenz der Stammzellen abnimmt.

20

Dieser Eigenschaft entsprechend wird die befruchtete Eizelle als totipotent, embryonale Stammzellen als pluripotent und adulte Stammzellen als multipotent bezeichnet.

25

Totipotente Zellen sind Zellen, aus denen sich ein vollständiger Organismus entwickeln kann; dazu zählen neben der befruchteten Eizelle auch die Zellen der frühen embryonalen Phase. Unter Pluripotenz versteht man, dass die typischerweise aus der inneren Zellmasse von disaggregierten Blastozysten gewonnenen embryonalen Stammzellen in der Lage sind, sich in Zellen aller drei Keimblätter – Mesoderm, Endoderm und Ektoderm - zu differenzieren.

30

Adulten Stammzellen hingegen wird nach bisheriger Lehrmeinung nur eine Multipotenz zugesprochen, d.h. dass eine Differenzierung in nur geringerem Umfang stattfinden kann. So sollten gewebespezifische Stammzellen nur zur Differenzierung in Zellen desselben

Gewebetyps in der Lage sein. In den letzten Jahren musste diese Auffassung zumindestens teilweise korrigiert werden, da Untersuchungen mit adulten Stammzellen, die z.B. aus dem Knochenmark (WO 02/064748) oder aus regenerativem Gewebe (WO 02/057430) erhalten worden waren, belegen, dass unter bestimmten Bedingungen, z.B. Transplantation in ein Zielgewebe, Kultivierung auf einem Feeder Cell Layer und/oder Kultivierung in Gegenwart spezieller Wachstumsfaktoren, auch die Differenzierung einzelner Stammzellen zu Zelltypen verschiedener Keimblätter erreichbar ist. Allerdings kommen auch diese adulten Stammzellen hinsichtlich Selbsterneuerungsvermögen und Differenzierungspotenzial den embryonalen Stammzellen noch nicht gleich. Insbesondere ist die Stabilität dieser Zelllinien bei Langzeitkultivierung nicht gewährleistet und die Zellen neigen zu spontaner Differenzierung und unter Umständen auch zur Entartung zu Tumorzellen. Ferner nimmt die Vermehrungsrate mit längerer Kultivierung deutlich ab.

Somit besteht in Anbetracht der ethischen Bedenken bezüglich embryonaler Stammzellen nach wie vor großes Interesse an neuen adulten Stammzellen mit möglichst großem Differenzierungspotenzial und Eigenschaften, die denjenigen der embryonalen Stammzellen gleichkommen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, neue adulte Stammzellen bereitzustellen, die in ihrem Selbsterneuerungsvermögen und Differenzierungspotenzial gegenüber embryonalen Stammzellen keine wesentlichen Unterschiede mehr aufweisen und als tatsächlich pluripotent bezeichnet werden können. Eine damit verbundene Aufgabe ist die Bereitstellung neuer und besonders einfacher Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von adulten pluripotenten Stammzellen und davon abgeleiteter differenzierter Zellen. Ein weitere damit verbundene Aufgabe ist die Bereitstellung neuer pharmazeutischer Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung verschiedener Krankheitszustände unter Verwendung pluripotenter adulter Stammzellen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch die Bereitstellung isolierter pluripotenter adulter Stammzellen, welche aus exokrinem Drüsengewebe erhalten wurden, und die erfindungsgemäßen Verfahren zur Isolierung und Kultivierung dieser Stammzellen und davon abgeleiteter differenzierter Zellen sowie durch die Bereitstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen und Behandlungsverfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Stammzellen bzw. davon abgeleiteter differenzierter Zellen.

Beschreibung der Erfindung

5 Adulte Stammzellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotenzial wurden bereits in zahlreichen Geweben gefunden. Es wurden auch schon mutmaßliche Stammzellen aus dem endokrinen insulin-produzierenden Drüsengewebe des Pankreas isoliert, wohingegen bisher noch nie aus irgendeinem exokrinen Drüsengewebe Zellen isoliert wurden, die als Stammzellen charakterisiert werden konnten.

10 Es ist daher ausgesprochen überraschend, dass das erfindungsgemäße Verfahren unter erstmaliger Verwendung von exokrinem Drüsengewebe auf besonders einfache Weise die Herstellung adulter Stammzellen ermöglicht, die hinsichtlich ihres Selbsterneuerungsvermögens und ihres Differenzierungspotenzials gegenüber embryonalen Stammzellen keine wesentlichen Unterschiede mehr aufweisen und als pluripotent zu bezeichnen sind.

15 Das als Ausgangsmaterial verwendete exokrine Drüsengewebe stammt vorzugsweise von einem Wirbeltier, z.B. einem Fisch, Amphibium, Reptil, Vogel oder Säuger, besonders bevorzugt von einem Primaten, insbesondere einem Menschen.

20 Das erfindungsgemäß verwendete exokrine Drüsengewebe kann von einem erwachsenen Organismus, juvenilen Organismus oder nicht-humanen fötalen Organismus, vorzugsweise einem post-natalen Organismus, stammen. Der Begriff "adult", wie in der vorliegenden Anmeldung verwendet, bezieht sich somit auf das Entwicklungsstadium des Ausgangsgewebes und nicht auf dasjenige des Donororganismus, aus dem das Gewebe stammt.

25 "Adulte" Stammzellen sind nicht-embryonale Stammzellen.

Vorzugsweise wird das exokrine Drüsengewebe aus einer Speicheldrüse, Tränendrüse, Talgdrüse, Schweißdrüse, aus Drüsen des Genitaltrakts, einschließlich Prostata, oder aus gastro-intestinalem Gewebe, einschließlich Pankreas, oder sekretorischem Gewebe der
30 Leber isoliert. In einer stark bevorzugten Ausführungsform handelt es sich dabei um acinäres Gewebe. Ganz besonders bevorzugt stammt das acinäres Gewebe aus dem Pankreas, der Ohrspeicheldrüse oder Unterkieferspeicheldrüse.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren bereitgestellten Stammzellen sind leicht zu isolieren und in einer stabilen Langzeitkultur ohne Feederzellschicht oder spezielle Zusätze im undifferenzierten Zustand zu halten. Der Begriff Feederzellen, wie in der vorliegenden Anmeldung verwendet, umfasst alle Zellen, die das Wachstum der eigentlich zu kultivierenden Zellen dadurch fördern, dass sie Wachstumsfaktoren freisetzen und/oder eine extrazelluläre Matrix bereitstellen, bzw. die Differenzierung der Stammzellkultur verhindern.

In Stammzellkulturen der Erfinder haben die Zellen nach bisher mehr als 25 Passagen über ein Jahr lang ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und uneingeschränkter Teilung behalten und die Kulturen sind weiterhin stabil. Nur ein sehr kleiner Teil der Stammzellen (ca. 3 %) differenziert spontan und wird bei einem Mediumwechsel problemlos mit dem alten Medium abgetrennt.

Darüber hinaus können die so produzierten Stammzellen bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs eingefroren gelagert werden und behalten ihre Differenzierbarkeit und Vitalität unverändert bei.

Die erfindungsgemäßen adulten Stammzellen können ohne Zusatz spezieller Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren auf einfache Weise zur Differenzierung angeregt werden, indem sie unter räumlichen Bedingungen kultiviert werden, welche für einen dreidimensionalen Kontakt der Zellen sorgen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind diese Bedingungen die Kultivierung in hängenden Tropfen, wie sie für embryonale Stammzellen bereits beschrieben wurde (Wobus et al., Biomed. Biochim. Acta 47:965-973 (1988)). Dieses Verfahren wird nachfolgend in den Beispielen noch näher beschrieben. Es versteht sich jedoch, dass alternative Kultivierungsverfahren, die für den gewünschten dreidimensionalen Kontakt der Zellen sorgen und dem Fachmann bekannt und verfügbar sind, ebenso verwendet werden können. Beispiele für solche alternativen Verfahren sind die Kultivierung in bewegter Suspensionskultur, die Kultivierung in einem elektromagnetischen Feldkäfig oder Laser-Tweezer oder die Kultivierung auf Oberflächen, an denen die Zellen nicht oder schlecht haften. Solche Oberflächen können z.B. Glas, Polystyrol oder mit einer Anti-Adhäsionsschicht behandelte Oberflächen, z.B. PTFE- oder Poly-HEMA-beschichtete Oberflächen, sein.

Unter diesen Bedingungen entwickeln sich spontan dreidimensionale Zellverbände oder Zellaggregate, welche vom Erfinder in Anlehnung an bereits für embryonale Stammzellen beschriebene "embryoid bodies" als "organoid bodies" oder organoide Körper bezeichnet wurden. Diese organoiden Körper oder Organoid Bodies können in Suspensionskulturen oder Adhäsionskulturen überführt und weiter kultiviert werden. Bei ausreichender Nährstoffversorgung wachsen diese organoiden Körper weiter und können Durchmesser von einigen Millimetern oder mehr erreichen. Diese großen Organoid Bodies zeigen eine gewebeatartige Struktur und werden in diesem Stadium zur Unterscheidung von den einfachen Zellaggregaten auch als "Gewebekörper" bezeichnet.

10

Bringt man die Organoid Bodies wieder in Oberflächenkultur, entsteht aus auswachsenden einzelnen Zellen eine zelluläre Monoschicht, aus der Multilayerbereiche hervorgehen, aus denen spontan sekundäre Organoid Bodies mit vergleichbaren Eigenschaften wie denjenigen der primären Organoid Bodies gebildet werden. Die erfindungsgemäßen Organoid Bodies können z.B. bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs eingefroren gelagert werden, ohne ihre Lebensfähigkeit, Vermehrungsfähigkeit, Wachstumsfähigkeit und Differenzierbarkeit zu verlieren.

Zellen, welche aus den organoiden Körpern auswachsen oder isoliert werden, können in die verschiedenen Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren. Zur Differenzierung sind keine Differenzierungsfaktoren notwendig und die Zellen müssen auch nicht transplantiert werden, um zu differenzieren. Es kann jedoch von Vorteil sein, solche Differenzierungsfaktoren einzusetzen, um gezielt größere Mengen eines bestimmten Zelltyps herzustellen. Solche Differenzierungsfaktoren sind im Stand der Technik bekannt und umfassen z.B. bFGF ("basic fibroblast growth factor") zur verstärkten Bildung von Herzzellen und Fibroblasten, VEGF ("vascular endothelial growth factor"), DMSO und Isoproterenol, Fibroblastenwachstumsfaktor 4 (FGF4), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) zur verstärkten Bildung von Herz- und Leberzellen, TGF-beta1 ("transforming growth factor beta1") zur verstärkten Bildung von Herzzellen, EGF ("epidermal growth factor") zur verstärkten Bildung von Haut- und Herzzellen, KGF ("keratinocyte growth factor") (machmal zusammen mit Cortison) zur Bildung von Keratinozyten, Retinsäure zur verstärkten Bildung von Nerven-, Herz- und Nierenzellen, beta-NGF ("beta nerve growth factor") zur verstärkten Bildung von Gehirn-, Leber-, Pankreas- und Nierenzellen, BMP-4

("bone morphogenic protein 4") und Activin-A zur Bildung mesodermaler Zellen generell, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

5 Differenzierte Zellen, die aus den erfindungsgemäßen pluripotenten Stammzellen erhältlich sind, umfassen Knochenzellen (Osteoblasten und Osteoclasten), Chondrozyten, Adipozyten, Fibroblasten (z.B. Haut- und Sehnenfibroblasten), Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, hematopoetische Zellen, sensorische Zellen, endokrine und exokrine Drüsenzellen, Gliazellen, neuronale Zellen, Oligodendrozyten, Blutzellen, Darmzellen, Herz-, Lungen-, Leber-, Nieren- oder Pankreaszellen, sind jedoch nicht darauf
10 beschränkt.

Die resultierenden differenzierten Zelltypen können durch histologische, immunozytochemische und elektronenmikroskopische Techniken identifiziert und charakterisiert werden.

15

Die erfindungsgemäßen adulten pluripotenten Stammzellen bzw. davon abgeleiteten differenzierten Zellen und organoiden Körper haben ein breites Spektrum möglicher Anwendungen auf medizinischen und nicht-medizinischen Gebieten. Beispielsweise können die Zellen einem tierischen oder humanen Patienten verabreicht werden, um eine
20 Verletzung oder einen Krankheitszustand zu behandeln.

Der zu behandelnde Krankheitszustand kann jeder Krankheitszustand sein, von dem zu erwarten steht, dass er mit Stammzellen erfolgreich behandelt werden kann. Solche Krankheitszustände können beispielsweise ein Tumor, eine Lungen-, Leber-, Nieren-
25 erkrankung, eine Bindegewbserkrankung, eine kardiovaskuläre Erkrankung, metabolische Erkrankung, neuro-degenerative Erkrankung, Autoimmunerkrankung, Anämie, Hämophilie, Diabetes, Ischämie, Entzündung, eine Infektionskrankheit, ein genetischer Defekt oder Transplantat-Abstoßung sowie Alterungsprozesse sein.

30 Vorzugsweise sind die verabreichten Zellen autolog, d.h. sie stammen von dem zu behandelnden Patienten, um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Die Behandlung kann z.B. darin bestehen, dass die verabreichten Zellen *in vivo* differenzieren, um die Funktion eines geschädigten oder fehlenden Organs oder Gewebes im Körper eines Patienten zu übernehmen. Das Organ oder Gewebe kann beispielsweise aus Knochenmark, Blut, Milz,

Lunge, Niere, Blase, Darm, Gehirn, Fettgewebe, Bindegewebe, Muskelgewebe, Herz, Blutgefäßen, Pankreas, ZNS, peripherem Nervensystem, Haut, insbesondere Schleimhäuten, ausgewählt sein.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform stärkt die Behandlung das Immunsystem des Patienten oder stellt es wieder her. In einer weiteren Ausführungsform besteht die Behandlung darin, dass Blut oder eine andere Körperflüssigkeit eines Patienten außerhalb des Körpers mit den Stammzellen oder davon abgeleiteten Zellen, z.B. Leber- oder Nierenzellen, in Kontakt gebracht wird, um z.B. die Körperflüssigkeit von Giftstoffen zu
- 10 befreien oder auf andere Weise einer therapeutischen oder diagnostischen Behandlung zu unterziehen, und dann die Körperflüssigkeit wieder in den Körper rückgeführt wird.

- Die verabreichten erfindungsgemäßen Stammzellen in einem Behandlungsverfahren können auch als gefahrloses Vehikel für ein therapeutisches Agens dienen. Das
- 15 therapeutische Agens kann z.B. DNA, RNA, ein Protein oder Peptid oder ein niedermolekularer Arzneiwirkstoff sein.

- Insbesondere können die Stammzellen gentechnisch manipuliert werden, um bestimmte Eigenschaften aufzuweisen, und dann zur Gentherapie eingesetzt werden. Solche
- 20 Eigenschaften können z.B. verringerte Antigenizität, Produktion gewünschter DNA, RNA, Proteine, fehlende Produktion unerwünschter DNA, RNA, Proteine, etc. sein.

- Die Verabreichung der Zellen kann nach jedem im Stand der Technik bekannten und für diesen Zweck geeigneten Verfahren erfolgen. Geeignete Verfahren schließen ein, sind
- 25 jedoch nicht beschränkt auf, lokale Injektion, systemische Injektion, parenterale Verabreichung, orale Verabreichung oder intrauterine Injektion in einen Embryo.

- In der Regel werden die zur Behandlung eingesetzten Stammzellen oder davon abgeleiteten differenzierten Zellen in einer pharmazeutischen Zusammensetzung vorliegen. Eine solche
- 30 Zusammensetzung kann neben den Zellen eine physiologisch annehmbare Matrix oder einen physiologisch annehmbaren Träger enthalten. Die Art der Matrix bzw. des Trägers wird unter anderem von dem vorgesehenen Verabreichungsweg abhängen. Geeignete Matrices bzw. Träger sind im Stand der Technik bekannt. Ferner kann die pharmazeutische Zusammensetzung gegebenenfalls weitere geeignete Hilfsstoffe oder Wirkstoffe enthalten.

Eine weitere mögliche Anwendung ist die Verwendung der Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, Stammzellkulturen nach einem der Ansprüche 10-13 oder der organoiden Körper nach einem der Ansprüche 15-18 oder der daraus erhaltenen differenzierten Zellen zur Entwicklung gewebeähnlicher oder organähnlicher multizellulärer Systeme *in vitro*. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die multizellulären Systeme dabei verschiedene Zellarten. Diese multizellulären Systeme können dann beispielsweise transplantiert werden oder extrakorporal, z.B. zur Blutwäsche oder zur Produktion gewünschter Substanzen, eingesetzt werden.

10

Eine noch weitere mögliche Anwendung ist die Verwendung der Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, Stammzellkulturen nach einem der Ansprüche 10-13 oder der organoiden Körper nach einem der Ansprüche 15-18 oder der daraus erhaltenen differenzierten Zellen oder multizellulären Systeme als *in vitro*-System zum Testen von Chemikalien, insbesondere zum Screenen von Arzneiwirkstoffen oder Kosmetika und/oder zur Analyse der Wirkung bekannter oder potenzieller Wirkstoffe oder Giftstoffe oder Mutagene auf die jeweiligen Zellen. Diese Wirkung kann beispielsweise eine Veränderung des Proliferationsvermögens, Differenzierungsvermögens oder der Lebensfähigkeit der Zellen sein.

20

Ebenfalls eine mögliche Anwendung ist die Bereitstellung komplexer zellulärer Systeme zur Analyse zellulärer Interaktionen.

Eine noch weitere Anwendung ist die Verwendung der aus den Stammzellen erhaltenen differenzierten Zellen zur Produktion gewünschter Substanzen *in vitro*.

25

Eine spezielle Anwendung für nicht-humane adulte Stammzellen ist die Verwendung der adulten Stammzellen oder davon erhaltenen differenzierten Zellen für das therapeutische oder reproduktive Klonieren. Dabei werden beispielsweise die adulten Stammzellen oder davon abgeleiteten differenzierten Zellen oder daraus isolierte Zellkerne in entkernte nicht-humane Oozyten eingebracht und die Oozyten unter Bedingungen kultiviert, welche zur Entwicklung von Blastozysten führen. Aus den Blastozysten können dann entweder embryonale Stammzellen gewonnen werden, welche in bekannter Weise zur Differenzierung in einen gewünschten Zelltyp veranlasst werden können (therapeutisches

30

Klonieren), oder die Blastozysten können bis zur Entwicklung eines Embryos gebracht werden, der einem weiblichen Tier implantiert und nach der entsprechenden Gestationszeit natürlich geboren werden kann (reproduktives Klonen).

- 5 In einer Ausführungsform der Erfindung werden die Stammzellen oder davon abgeleiteten Organoid Bodies oder differenzierten Zellen in Form eines Kits bereitgestellt. Ein solcher Kit kann die Zellen als solche oder als pharmazeutische Zusammensetzung wie oben definiert umfassen. Ferner kann der Kit weitere Hilfsmittel, z.B. zur Verabreichung der Zellen, oder Reagenzien, z.B. Reagenzien zur Kultivierung der Zellen oder diagnostische
10 Reagenzien, umfassen.

FIGURENBESCHREIBUNG

- Fig. 1 zeigt schematisch die Kultivierung der Stammzellen in Oberflächenkultur und in hängenden Tropfen sowie die Bildung und weitere Kultivierung von organoiden
15 Körpern.

- Fig. 2 zeigt den immunhistologischen Nachweis von Epithel- und Drüsenzellen mit entodermalen Eigenschaften, die aus den erfindungsgemäßen Stammzellen aus Ratten-Pankreas hergestellt wurden. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin und Amylase angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI
20 angefärbt.

- Fig. 3 zeigt den immunhistologischen Nachweis von differenzierten Muskelzellen mit mesodermalen und Nervenzellen mit ektodermalen Eigenschaften, die aus den erfindungsgemäßen Stammzellen aus Ratten-Pankreas hergestellt wurden. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen α -smooth-muscle-actin (SMA) und Neurofilament (NF) angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI
25 angefärbt.

- Fig. 4 zeigt die Expression von Markern neuronaler, glialer und glatter Muskelzellen sowie von Amylase und Insulin.
a,b: PGP 9.5-markierte Nervenzellen zeigen multipolare Ausläufer, welche
30 zahlreiche Varikositäten zeigen. c,d: das Neurofilament-System (helle Pfeile, im Originalfoto grün markiert) reicht durch das Pericaryon in die cytoplasmatischen Ausläufer. In enger Nachbarschaft liegen GFAP-immunreaktive Gliazellen (dunkle

- Pfeile, im Originalfoto rot markiert). e,f: α -SMA-markierte Zellen (dunkle Pfeile, im Original rot) und NF-markierte Nervenzellen (helle Pfeile, im Original Grün) bilden ein primitives neuro-muskuläres Netzwerk (e), wobei Kontakte über beträchtlich lange Entfernungen etabliert werden (f). g: Immunfärbung von GFAP (dunkle Pfeile, im Original rot) und NF (helle Pfeile, im Original grün) in 3 Wochen alten OB mit Konzentrationen an Nerven- und Gliazellen. h: Immunfärbung von α -SMA (dunkle Pfeile, im Original rot) und NF (helle Pfeile, im Original grün) in 3 Wochen alten OBs in einem fortgeschrittenen Stadium der Bildung eines neuro-muskulären Netzwerks. i,j: in Querschnitten von 8 Wochen alten OBs wurden für NF immunreaktive Zellen in direkter Nachbarschaft von Zellen gefunden, die immunreaktiv für α -SMA waren, ähnlich wie in nativen Geweben. k: eine Untergruppe von Zellen zeigt eine positive Färbung für Amylase (helle Pfeile, im Original grün). Die Amylase-enhaltenden Zellen sind kreisförmig gruppiert, wie anhand der topographischen Anordnung ihrer Kerne festgestellt, und speichern das exokrine Sekret innerhalb der apikalen Zellpole und zeigen damit morphologische Merkmale von exokrinen pankreatischen Acini. l: Eine weitere Zelluntergruppe enthält granuläre Vesikel mit Immunreaktivität für Insulin. Das endokrine Produkt ist nicht homogen verteilt, sondern in einem polaren Muster gespeichert. Die Kerne sind mit DAPI kontrastgefärbt (im Original blau).
- 20 Fig. 5 zeigt die Expression von extrazellulären Matrixkomponenten und Cytokeratinen.
- a,b: Globuläre (a) und fibrilläre (b) Speicher von Proteoglycanen ergaben eine Färbung mit Alcianblau. c-e: Die globulären (c) und fibrillären (d) Bereiche sind immunreaktiv für das Knorpelmatrixprotein Kollagen II. Dicht verteilte Zellen werden neben der sich entwickelnden extrazellulären Matrix beobachtet. Zwei individuelle Zellen (e) zeigen eine cytoplasmatische Markierung von Kollagen II. f: Zellen, die für Cytokeratine immunreaktiv sind, sind in Clustern angeordnet. g: konfokale Laserscanningmikroskopie eines OB. Die Kollagen II-Immunreaktivität (dunkle Pfeile, im Original rot markiert) nimmt zur Mitte des OB hin zu. Vigilin-immunreaktive Zellen (helle Pfeile, im Original grün markiert) sind hauptsächlich am äußeren Rand des OB lokalisiert, was deren hohe Translationsaktivität anzeigt. Die Kerne sind mit DAPI kontrastgefärbt.

Fig. 6 zeigt die Transmissionselektronenmikroskopie differenzierter OB.

- a-c: glatte Muskelzellen mit Myofilamenten. Das Myofilamentsystem erstreckt sich über das Cytoplasma in disseminierten Bündeln (a) und zeigt typische dichte Körper (Pfeile) (b). Die Myoblasten zeigen sternförmige Zellausläufer, die ein verbindendes Netzwerk bilden (c). d: Zellausläufer mit einer Ansammlung von zahlreichen Vesikeln kleiner Größe, die höchstwahrscheinlich Nervenfaservarikositäten entsprechen. e: Kollagen- und Retikulumfasern. Das typische gestreifte Muster (periodische Banden) von Kollagenfasern ist in längsgeschnittenen Fibrillen wahrnehmbar. f-h: Sekretorische Zellen zeigen elektrodichte Vesikel. Die Vesikel nehmen nicht das ganze Cytoplasma ein, sondern sind an einem Zellpol gespeichert (f). Häufig kontaktieren sekretorische Zellen einander, um acinusartige Strukturen zu bilden (g). Ein Untergruppe von sekretorischen Zellen enthält Vesikel (Pfeil) die Ultrastruktur-Merkmalen von endokrinen Granula entsprechen (h), z.B. Beta-Granula von insulinproduzierenden Zellen. i: Beginn der Ausbildung einer Epitheloberfläche (Pfeil) in acht Wochen alten OBs. j: typische Zellkontakte zwischen Keratinozyten und Desmosomen (Pfeile)

Fig. 7 zeigt schematisch die Hauptstufen der erfindungsgemäßen Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von adulten Stammzellen und zur Gewinnung organoider Körper und eines breiten Spektrums differenzierter Zellen daraus.

- Fig. 8 zeigt schematisch verschiedene Einzelschritte der erfindungsgemäßen Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von adulten Stammzellen und zur Gewinnung organoider Körper.

- Fig. 9 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Stammzellen und organoiden Körper nach verschiedenen Einzelschritten der erfindungsgemäßen Verfahren zur Isolierung und Kultivierung von adulten Stammzellen und zur Gewinnung organoider Körper.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die adulten Stammzellen aus acinärem Gewebe erhalten.

- Entsprechend dem in Fig. 1 dargestellten Schema wird zur Gewinnung der Zellen acinäres Gewebe - bevorzugt der Ohrspeicheldrüse oder Bauchspeicheldrüse (Pankreas) - mechanisch und enzymatisch zerkleinert in Kultur genommen [Schritt 10 in Fig. 1]. Entgegen den Angaben von Bachem et al., Gastroenterol. 115:421-432 (1998), und

Grosfils et al., Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 79:99-115 (1993), werden keine Geweblöcke kultiviert, aus denen Zellen auswachsen sollen, sondern unter der Bedingung, dass die Zellverbände der Acini weitestgehend intakt bleiben, das Gewebe stärker zerkleinert.

5

Über mehrere Wochen werden diese Zellen und Zellverbände in Kulturgefäßen kultiviert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt, wobei alle differenzierten Zellen entfernt werden. Bei den in Kultur persistierenden Zellen handelt es sich um undifferenzierte Zellen mit uneingeschränkter Teilungsfähigkeit.

10

Ähnliche Zellen sind unter gleichen Bedingungen aus dem Pankreas isoliert und beschrieben und als eine Art Myofibroblasten bzw. pankreatische Sternzellen bezeichnet worden (Bachem et al., 1998). Im Gegensatz zu den Zellen der vorliegenden Erfindung konnte eine uneingeschränkte Teilungsfähigkeit jedoch nicht beobachtet werden. Weiterhin konnten diese Zellen auch nicht unbegrenzt passagiert werden, ohne an Vitalität zu verlieren.

15

In einem zweiten Schritt [12] werden ungefähr 400 bis 800 Zellen in je 20 µl Medium in hängenden Tropfen kultiviert. Dazu werden die Tropfen auf Deckel von bakteriologischen Petrischalen gegeben, umgedreht und über die mit Medium gefüllte Petrischale gelegt, sodass die Tropfen nach unten hängen.

20

Durch diese Art der Kultivierung bilden sich innerhalb von 48 h als "organoid bodies" bezeichnete Zellaggregate [14], die für ungefähr 6 Tage in eine Suspensionskultur umgesetzt werden [16]. Die Teilansicht [18] aus Fig. 1 zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines solchen Organoid Body.

25

Die in Suspensionskultur wachsenden Organoid Bodies bilden neue Organoid Bodies, die auch bei Einzelzellen die Bildung von neuen Organoid Bodies induzieren. Die Zellen sind sowohl als Organoid Bodies als auch als Einzelzellen einfrierbar und behalten dabei ihre Vitalität und ihr Differenzierungspotenzial.

30

Die Figuren 2-6 zeigen mikroskopische und elektronenmikroskopische Aufnahmen von differenzierten Zellen, die aus solchen Organoid Bodies erhalten wurden.

- Dabei konnte z.B. die Bildung eines neuro-muskulären Netzwerks beobachtet werden: Aus OBs erhaltene Zellen exprimierten stark α -SMA ("smooth-muscle-actin") (Fig. 4e-f). Die Anwesenheit verbreiteter Bündel von Myofilamenten, welche sich über das Cytoplasma erstreckten, wurde durch Elektronenmikroskopie bestätigt (Fig. 6a-c). Ferner
- 5 wurden Zellen identifiziert, welche für den pan-Neuronenmarker PGP 9.5 und für Neurofilamente (NF) immunreaktiv waren. Das Neurofilamentsystem reichte vom Pericaryon in die radialen cytoplasmatischen Ausläufer (Fig. 4c,d). PGP 9.5-immunreaktive Zellen zeigten zahlreiche Varikositäten entlang ihrer verzweigten Ausläufer (Fig. 4a,b, 6d) und entsprachen damit typischen morphologischen Merkmalen autonomer
- 10 Nervenfasern. Zellen, die für GFAP ("glial fibrillary acidic protein") immunreaktiv waren, befanden sich in enger Nachbarschaft zu Zellen, die neuronale Marker exprimierten (Fig. 4c,d). Häufig erstreckten sich die filamentösen Proteine nicht durch das gesamte Cytoplasma, sondern waren auf Gebiete neben den Nervenzellen beschränkt. Ferner waren
- 15 glatte Muskelzellen und Nervenzellen nicht willkürlich verstreut, sondern bildeten zusammenhängende Netzwerke mit unschwer unterscheidbaren Verbindungen (Fig. 4e,f). Nervenfaserausläufer erstreckten sich über beträchtlich große Entfernungen, um benachbarte glatte Muskelzellen als ihre mutmaßlichen Ziele zu kontaktieren. Somit zeigten die beiden Zelltypen aufgrund ihrer topographischen Anordnung Merkmale eines primitiven neuromuskulären Netzwerks. Bei 3 Wochen alten OBs wurde eine beginnende Bildung von
- 20 gewebeähnlichen Strukturen festgestellt (Fig. 4g-j). Hier wurde ein Cluster von faserförmigen Nervenzellen in Kontakt mit Gliazellen gefunden (Fig. 4g) oder weiter entwickelt zu einem dreidimensionalen neuro-muskulären Netzwerk (Fig. 4h), was in Querschnitten von 8 Wochen alten OBs bestätigt wurde (Fig. 4i,j).
- 25 **Nachweis der Expression exokriner und endokriner pankreatischer Proteine:**
- Immunhistochemische Anfärbungen zeigten, dass zelluläre Untergruppen positiv für Amylase waren (Fig. 4k). Das Immunreaktionssignal war auf klar unterscheidbare Vesikel innerhalb des apikalen Cytoplasmas beschränkt. Darüber hinaus waren die meisten Zellcluster, die für Amylase immunreaktiv waren, in Kreisen angeordnet, wobei die
- 30 sekretorischen Vesikel eine Position zur Mitte hin aufwiesen, welches eine morphologische Anordnung ähnlich der von exokrinen Pankreas-Acini ist. Andere zelluläre Untergruppen zeigten Immunreaktivität für Insulin (Fig. 4l). Ähnlich wie bei den Amylase-positiven Zellclustern, war das sekretorische Produkt in vesikulären Strukturen gespeichert, die an einem Zellpol konzentriert waren. Die Anwesenheit sekretorischer Zellen wurde durch

Elektronenmikroskopie bestätigt, welche dicht verteilte elektrodichte Partikel zeigte, wie sie charakteristisch für exkretorische oder inkretorische Funktionen sind (Fig. 6f-h).

Ebenfalls beobachtet wurde eine Differenzierung in chondrogene Zellen und Epithelzellen:

- 5 Nach einer Wachstumsperiode von zwei Monaten zeigten OBs chondrogene Eigenschaften. Eine Alcianblaufärbung offenbarte Bereiche mit hohen Konzentrationen an Proteoglycanen (Chondroitinsulfat), die entweder als globuläre (Fig. 5a) oder fibrilläre (Fig. 5b) Ablagerungen vorkamen. Immunhistochemische Anfärbungen mit Antikörpern, die gegen das Knorpelmatrixprotein Kollagen II gerichtet waren, belegten zusätzlich die chondrogene
- 10 Aktivität innerhalb dieser globulären (Fig. 5c) und fibrillären (Fig. 5d) Bereiche. Die Immunreaktivität war am höchsten in der Mitte der zellulären Aggregate, die am wahrscheinlichsten Bereichen von sich entwickelnder extrazellulärer Knorpelmatrix entsprach. Diese Beobachtung wurde durch konfokale Mikroskopie bestätigt (Fig. 5g): während die Menge der Kollagen-Speicher zur Mitte der zellulären Aggregate hin zunahm,
- 15 waren die Randbereiche durch aktiv translatierende Zellen charakterisiert, wie durch deren hohe Vigilin-Expression demonstriert, die gewöhnlich bei Zellen mit aktiver Translationsmaschinerie, z.B. Kollagen-synthetisierenden Chondrozyten oder in Fibroblasten während der Chondroinduktion, gefunden wird. Typische einzelne Kollagen II-translatierende Chondrozyten wurden auch in auswachsenden Zellen von OBs
- 20 beobachtet, die eine Kollagen II-haltige Matrix produzierten, welche die Einzelzellen umgab (Fig. 5e). Eine Ultrastruktur-Untersuchung dieser Bereiche konnte klar ein Netzwerk von Retikulumfasern und Kollagenfasern zeigen, wobei die letzteren durch ihre charakteristisches Bandenmuster identifiziert wurden (Fig. 6e). Einige Zellen exprimierten neben mesenchymalen Markern auch mehrere Cytokeratine, was deren Potenzial zur
- 25 Differenzierung in Epithelzellen anzeigt. Jedoch wurden Zellen, die für Cytokeratine immunreaktiv waren, weniger häufig gefunden als Zellen, die Marker von glatten Muskelzellen und Neuronen exprimierten. Typischerweise waren sie in Clustern angeordnet, die innerhalb der OBs disseminiert waren (Fig. 5f). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden typische Zellkontakte zwischen
- 30 Keratinozyten gefunden (Fig. 6j) und bei 8 Wochen alten OBs wurden Epithelzellen auf der Oberfläche gefunden, welche aus dem Zellkulturmedium in die Luft wuchs.

Insgesamt konnten bisher z.B. folgende Marker für spezifische Zellen positiv getestet werden: PGP 9.5 und NF für Nervenzellen, S 100 und GFAP für Gliazellen, SMA für

Muskelzellen (bzw. Myofibroblasten), Kollagen Typ II für Knorpelzellen, Amylase und Trypsin für exokrine Drüsenzellen, Insulin für endokrine Drüsenzellen, Vigilin für stark translatierende Zellen und Cytokeratin für epidermale Zellen. Neben den licht-mikroskopischen Untersuchungen konnten auch elektronenmikroskopisch verschiedene Zelltypen morphologisch charakterisiert werden, sowie Zell-Zell-Kontakte als Zeichen für zelluläre Interaktionen gefunden werden.

Es wurden bisher u.a. glatte Muskelzellen, Neuronen, Gliazellen, Epithelzellen, Fettzellen, Herzzellen, Nierenzellen, Fibroblasten (z.B. Haut- und Sehnenfibroblasten), Chondrozyten, endokrine und exokrine Drüsenzellen und damit Zelltypen aller drei Keimblätter nachgewiesen.

In den folgenden, nicht-beschränkenden Beispielen soll die vorliegende Erfindung näher erläutert werden.

15

Die allgemeinen Arbeitsanweisungen, wie sie für Verfahren zur Kultivierung von tierischen Zellen und insbesondere von Säugetierzellen gebräuchlich sind, sind zu beachten. Eine sterile Umgebung, in der das Verfahren durchgeführt werden soll, ist - auch wenn hierzu keine weitere Beschreibung erfolgt - in jedem Fall einzuhalten. Folgende Puffer und Medien wurden verwendet:

20

<u>HEPES-Stammlösung (pH 7,6)</u>	<u>2,3 83 g HEPES auf 100 ml A. bidest.</u>
HEPES-Eagle-Medium (pH 7,4)	90 ml Modified Eagle Medium (MEM)
25	<u>10 ml HEPES-Stammlösung</u>
Isolationsmedium (pH 7,4)	32 ml HEPES-Eagle-Medium
	8 ml 5% BSA in A. bidest.
	300 µl 0,1 M CaCl ₂
30	100 µl Trasylol (200.000 KIE)
Digestionsmedium (pH 7,4)	20 ml Isolationsmedium
	<u>4 ml Kollagenase (Kollagenase NB 8 von Serva)</u>
<u>Incubationsmedium</u>	<u>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</u>

	Nährmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) DMEM + 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin - Pyruvat
5		+ 20 % FKS (inaktiviert) + 1 ml/100 ml Pen/Strep (10000 E/10000 µg/ml) oder DMEM + 10 % Eigenplasma + 1 ml/100 ml Pen/Strep,
10		<u>vor Gebrauch auf 37°C erwärmen</u>
	Differenzierungsmedium	380 ml DMEM 95 ml 30 min bei 54 °C inaktiviertes FKS 5 ml Glutamin (GIBCO BRL) 5 ml (3,5 µl β-Mercaptoethanol auf 5 ml PBS) 5 ml Non-essential amino acids (GIBCO BRL) 5 ml Penicillin/Streptomycin (GIBCO BRL) (10000 E/10000 µg/ml)

20 Statt fötalem Kalbserum (FKS) im Nährmedium und Differenzierungsmedium kann gegebenenfalls auch Eigenplasma oder, weniger bevorzugt, Eigenserum des Gewebedonors verwendet werden. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn der Gewebedonor mit dem späteren Empfänger der Stammzellen oder davon abgeleiteten differenzierten Zellen identisch ist. Eine solche autologe Behandlung ist zur Verhinderung einer eventuellen Abstoßungsreaktion bevorzugt.

25 Das Nährmedium kann als Basismedium statt des verwendeten DMEM-Mediums auch ein anderes für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen, insbesondere Säugerzellen, bekanntes, geeignetes Basismedium enthalten, in dem die differenzierten Zellen absterben und sich die gewünschten Stammzellen vermehren. Auch Isolationsmedium, Inkubationsmedium und Differenzierungsmedium können ein anderes übliches und geeignetes
30 Basismedium enthalten.

Die folgenden Beispiele 1 und 2 beschreiben detailliert zwei Arbeitsprotokolle zur Isolierung und Kultivierung adulter pluripotenter Stammzellen aus acinärem Gewebe des

Pankreas. Beispiel 3 beschreibt ein entsprechendes Protokoll für die Isolierung aus acinärem und tubulösem Gewebe der Speicheldrüse.

BEISPIEL 1

5 1. Präparation des Gewebes und Isolierung der Zellen

In den *Ductus pancreaticus* von 2-3 Jahre alten Ratten werden mittels einer Spritze und einer stumpfen Kanüle bei der Ratte 10 ml Digestionsmedium langsam und luftblasenfrei injiziert. Das gesamte Pankreas wird dadurch aufgeblasen und kann so besser herauspräpariert werden. Das Pankreas wird dann in ein Becherglas überführt und weitere
10 5 ml Digestionsmedium dazugegeben. Nachdem man das Fettgewebe und Lymphknoten entfernt hat, wird das Gewebe im Becherglas mit einer feinen Schere sehr fein zerkleinert, oben schwimmendes Fettgewebe abgesaugt und die Suspension wird abschließend 1 min mit Carbogen begast (wenn nötig wiederholen) und für 20 min bei 37 °C mit Alufolie bedeckt in einem Schüttler bei 200 Zyklen/min inkubiert. Danach saugt man das Medium
15 vorsichtig ab, zerkleinert erneut mit einer Schere das Gewebe und wäscht die Gewebestücke zweimal mit je 10 ml Isolationsmedium und gibt wieder 5 ml Digestionsmedium zum Gewebe hinzu.

Nach erneutem Begasen mit Carbogen für etwa 1 min und Inkubation für 15 min bei 37 °C
20 in einem Schüttler bei 200 Zyklen/min werden die Gewebestücke durch sukzessives Aufziehen in jeweils einer 10 ml, 5ml, 2 ml und 1 ml Glaspipette zerkleinert und durch einlagiges Filtergewebe gepresst. Die so vereinzelteten Zellen werden nun fünfmal in Inkubationsmedium gewaschen (37 °C), mit Carbogen begast und jedes Mal 5 min bei 90 g zentrifugiert. Das zuletzt erhaltene Pellet wird in Inkubationsmedium resuspendiert, begast
25 und auf Gewebekulturschalen verteilt.

2. Kultivierung der Zellen

Die Gewebekulturschalen mit den isolierten Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt. Dabei werden alle
30 differenzierten Zellen entfernt.

Am siebenten Tag in Kultur werden die Zellen mit einer Lösung bestehend aus 2 ml PBS, 1 ml Trypsin und 2 ml Inkubationsmedium passagiert. Dabei lösen sich die Zellen vom

Boden der Kulturschale. Die Zellsuspension wird 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf eine mittlere Zellkulturflasche überführt und 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben. Der Medienwechsel erfolgt alle drei Tage.

5

Am vierzehnten Tag in Kultur werden die Zellen erneut, aber diesmal mit 6 ml PBS, 3 ml Trypsin und 6 ml Inkubationsmedium, passagiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 6 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf 3 mittlere Zellkulturflaschen überführt und jeweils 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

10

Die Zellen werden weiter kultiviert und so oft passagiert und ausgesät, bis die Zellen einen semikonfluenten bis konfluenten Zustand erreichen.

15

BEISPIEL 2

Pankreas-Acini wurden von männlichen Sprague-Dawley-Ratten (20-300 g) erhalten, die narkotisiert (CO₂) und über die dorsale Aorta ausgeblutet worden waren. Eine Kanüle wurde trasduodenal in den Pankreasgang eingeführt und dem Pankreas wurde von hinten 10 ml Digestionsmedium, enthaltend HEPES-Eagle-Medium (pH 7,4), 0,1 mM HEPES-Puffer (pH, 7,6), 70% (Vol./Vol.) modifiziertes Eagle-Medium, 0,5 % (Vol./Vol.) Trasylol (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), 1 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin), 2,4 mM CaCl₂ und Kollagenase (0,63 P/mg, Serva, Heidelberg, Deutschland) injiziert.

20

Vor der Entfernung wurde der Pankreas von anhaftendem Festgewebe, Lymphknoten und Blutgefäßen teilweise befreit. Dann wurde gesundes Pankreasgewebe in Digestionsmedium abgeholt (bei 20 °C, geringerer Stoffwechsel), das Pankreasgewebe mit einer Schere sehr fein zerkleinert, oben schwimmendes Fettgewebe abgesaugt und die Gewebesuspension mit Carbogen (Messer, Krefeld, Deutschland) begast, ohne dass die Düse in das Medium mit den Zellen gelangt (Verringerung von mechanischem Streß) und damit auf pH 7,4 eingestellt. Danach wurde die Suspension in einem 25-ml-Erlenmeyerkolben (mit Alufolie bedeckt) unter konstantem Schütteln (150-200 Zyklen pro Minute) bei 37 °C in 10 ml Digestionsmedium inkubiert. Nach 15-20 Minuten wurde das oben schwimmende Fett und das Medium abgesaugt und das Gewebe wurde erneut zerkleinert und mit Medium ohne Kollagenase gespült (Vorgang mindestens zweimal wiederholen, vorzugsweise solange bis

25

30

Zellfraktion transparent), worauf Digestionsmedium zugegeben und erneut etwa 1 Minute lang mit Carbogen begast wurde. Es folgte wiederum eine Digestion mit Kollagenase für 15 Minuten bei 37°C im Schüttler unter Verwendung desselben Puffers. Nach der Digestion wurden die Acini durch sukzessives Hochziehen und Ausstossen durch 10 ml-, 5 ml- und 2 ml-Glaspipetten mit engen Öffnungen dissoziiert und durch ein einlagiges Nylonsieb (Polymon PES-200/45, Angst & Pfister AG, Zürich, Schweiz) mit einer Maschengröße von etwa 250 µm filtriert. Die Acini wurden zentrifugiert (bei 37°C und 600-800 UpM in einer Beckman-GPR-Zentrifuge, entspricht etwa 50-100 g) und weiter gereinigt durch Waschen in Inkubationsmedium, enthaltend 24,5 mM HEPES (pH 7,5), 96 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM NaH₂PO₄, 0, mM CaCl₂, 11,5 mM Glucose, 5 mM Natriumpyruvat, 5 mM Natriumglutamat, 5 mM Natriumfumarat, 1 % (Vol./Vol.) modifiziertes Eagle-Medium, 1 % (Gew./Vol.) Rinderserumalbumin, mit Carbogen äquilibriert und auf pH 7,4 eingestellt. Die Waschprozedur (Zentrifugation, Absaugen, Resuspension) wurde fünfmal wiederholt. Soweit nicht anders angegeben, wird bei der obigen Isolierung bei etwa 20 °C gearbeitet.

Die Acini wurden in Inkubationsmedium resuspendiert und bei 37°C in einer angefeuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Das acinäre Gewebe starb dabei schnell (innerhalb von zwei Tagen) ab und die sterbenden differenzierten Zellen lösten sich dabei von den benachbarten Zellen, ohne diese zu schädigen (schonende Isolierung), die nicht absterbenden Stammzellen sanken zu Boden und hefteten sich an. Die differenzierten Acinzellen sind dazu nicht in der Lage. Das Inkubationsmedium wurde am zweiten oder dritten Tag nach dem Aussäen erstmals gewechselt, wobei ein Großteil der frei schwimmenden Acini und acinären Zellen entfernt wurde. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die ersten Stammzellen bzw. deren Vorläufer am Boden festgesetzt und begannen sich zu teilen. Der Mediumwechsel wurde danach an jedem dritten Tag wiederholt und differenzierte acinäre Pankreaszellen wurden bei jedem Mediumwechsel entfernt.

Am siebenten Tag in Kultur wurden die Zellen mit einer Lösung bestehend aus 2 ml PBS, 1 ml Trypsin (+ 0,05 % EDTA) und 2 ml Inkubationsmedium passagiert. Dabei lösen sich die Zellen vom Boden der Kulturschale. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei etwa 1000 UpM (Beckmann GPR-Zentrifuge) zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2 ml Inkubationsmedium resuspendiert, auf eine mittlere Zellkulturflasche überführt und 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

Am vierzehnten Tag in Kultur wurden die Zellen erneut, aber diesmal mit 6 ml PBS, 3 ml Trypsin/EDTA und 6 ml Inkubationsmedium, passagiert. Die Zellsuspension wird 5 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 6 ml
5 Inkubationsmedium resuspendiert, auf 3 mittlere Zellkulturflaschen überführt und jeweils 10 ml Inkubationsmedium dazugegeben.

Am Tag 17 erfolgte ein drittes Passagieren auf insgesamt 6 mittlere Zellkulturflaschen und am Tag 24 ein viertes Passagieren auf insgesamt 12 mittlere Zellkulturflaschen. Spätestens
10 jetzt waren alle primären Zellen bis auf die Stammzellen aus der Zellkultur entfernt.

Die Stammzellen können weiter kultiviert werden und so oft passagiert und ausgesät wie gewünscht. Das Aussäen erfolgt vorzugsweise jeweils in einer Dichte von $2-4 \times 10^5$ Zellen/cm² in Inkubationsmedium.

15

BEISPIEL 3

Die Isolierung und Kultivierung aus exokrinem Gewebe der Ohrspeicheldrüse erfolgte analog dem Pankreas-Protokoll mit den folgenden Abweichungen:

1. Das exokrine Gewebe der Ohrspeicheldrüse war eine Mischung von acinärem Gewebe
20 und tubulösem Gewebe.
2. Nachdem Speicheldrüsen weniger Proteasen und Amylasen als Pankreas enthalten, ist es möglich, das Speicheldrüsengewebe vor der Aufarbeitung einige Zeit im Kühlschrank bei etwa 4°C aufzubewahren, ohne dass das Gewebe zu sehr geschädigt wird. Im konkreten Beispielsfall betrug die Aufbewahrungszeit 15 h und brachte keine nachteiligen Folgen für
25 die Isolierung der gewünschten Stammzellen mit sich.

Die folgenden Beispiele 4 und 5 beschreiben detailliert zwei Arbeitsprotokolle zur Herstellung von organoiden Körpern (Organoid Bodies) und differenzierten Zellen.

30

BEISPIEL 4

Die undifferenzierten Zellen werden mit einer Lösung aus 10 ml PBS, 4 ml Trypsin, 8 ml Differenzierungsmedium abtrypsiniert und 5 Minuten abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird so in Differenzierungsmedium resuspendiert, dass sich eine Verdünnung von

3000 Zellen je 100 µl Medium einstellt. Anschließend werden die Zellen nochmals gut mit einer 3 ml Pipette suspendiert.

5 Von bakteriologischen Petrischalen, die vorher mit jeweils 15 ml PBS (37 °C) pro Platte beschichtet worden sind, wird der Deckel abgenommen und umgedreht. Mit Hilfe einer automatischen Pipette werden auf einen Deckel ca. fünfzig 20 µl Tropfen gegeben. Der Deckel wird dann schnell umgedreht und auf die mit Differenzierungsmedium gefüllte Petrischale gegeben, sodass die Tropfen nach unten hängen. Die Petrischalen werden anschließend vorsichtig in den Brutschrank gestellt und für 48 h inkubiert.

10

Daraufhin werden die in den hängenden Tropfen aggregierten Zellen, die hier Organoid Bodies (OB) genannt werden sollen, aus jeweils vier Deckeln in je eine bakteriologische Petrischale mit 5 ml Inkubationsmedium mit 20 % FKS überführt und für weitere 96 h kultiviert.

15

Die Organoid Bodies werden nun vorsichtig mit einer Pipette aufgesammelt, und in mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße mit Differenzierungsmedium überführt. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens verwendet man als Kulturgefäß mit 0,1 % Gelatine beschichtete 6 cm Petrischalen, in die 4 ml Differenzierungsmedium
20 vorgelegt wurde und die anschließend mit je 6 Organoid Bodies beschickt werden. Ein weiteres bevorzugtes Kulturgefäß sind mit 0,1 % Gelatine beschichtete Chamber Slides, in die 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 3-8 Organoid Bodies beschickt werden. Daneben können auch 24-Mulden-Mikrotiterplatten verwendet werden, die mit 0,1 % Gelatine beschichtet wurden und in die je 1,5 ml pro
25 Mulde Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und anschließend mit je 4 Organoid Bodies beschickt werden.

Derart kultiviert, ist die Differenzierungsfähigkeit der Zellen in den Organoid Bodies aktiviert und die Zellen differenzieren sich in Zellen der drei Keimblätter Mesoderm,
30 Entoderm und Ektoderm. Die Zellen können sowohl als Organoid Bodies als auch als einzelne Zellen gelagert und kultiviert werden und behalten ihre Pluripotenz.

BEISPIEL 5

- Für die Induktion der Differenzierung wurden vorzugsweise Stammzellen nach dem 42. Tag der Kultivierung verwendet. Die Verwendung von Stammzellen nach der 3. oder 4. Passage oder von Zellen, die bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff 12-18 Monate lang gelagert worden waren, war ebenfalls problemlos möglich.

- Zunächst wurden die Zellen in Differenzierungsmedium mit der oben angegebenen Zusammensetzung überführt und auf eine Dichte von etwa 3×10^4 Zellen/ml eingestellt; z.B. durch Trypsinbehandlung einer Stammzellkultur in Nährmedium, 5-minütige Zentrifugation bei 1000 UpM und Resuspendierung des Pellets in Differenzierungsmedium und Verdünnung soweit erforderlich.

- Anschließend wurden mit einer 20- μ l-Pipette ca. 50 20- μ l-Tropfen (600 Zellen/20 μ l) auf die Innenseite des Deckels einer bakteriologischen Petrischale gegeben (gestopfte Spitzen) und die Deckel vorsichtig auf die mit PBS gefüllten Petrischalen gestülpt, sodass die Tropfen nach unten hängen. Für jeden Deckel wurde eine neue Spitze verwendet. Die Petrischalen wurden anschließend vorsichtig in den Brutschrank gestellt und 48 h lang bei 37°C inkubiert.

- Danach wurden die in den hängenden Tropfen aggregierten Zellen, die Organoid Bodies (OB), aus jeweils vier Deckeln in je eine bakteriologische Petrischale mit 5 ml Inkubationsmedium mit 20 % FKS überführt (Deckel schräg halten und die OBs mit etwa 2,5 ml Nährmedium abspülen) und für weitere 5-9 Tage, vorzugsweise 96 h, kultiviert.

- Die Organoid Bodies wurden nun vorsichtig mit einer Pipette aufgesammelt und in mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturgefäße mit Differenzierungsmedium überführt. Die OB vermehrten sich nun und wuchsen in zum Teil einzelnen Zellkolonien, die wieder vermehrt, vereinzelt und vermehrt werden konnten. In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens wurden als Kulturgefäß mit 0,1 % Gelatine beschichtete 6 cm Petrischalen verwendet, in die 4 ml Differenzierungsmedium vorgelegt worden war, und diese mit je 6 Organoid Bodies beschickt. Ein weiteres bevorzugtes Kulturgefäß waren mit 0,1 % Gelatine beschichtete Chamber Slides, in die 3 ml Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 3-8 Organoid Bodies beschickt wurden, und Thermanox-Platten (Nalge Nunc International, USA) für elektronenmikroskopische

Studien. Ein weitere Alternative waren 24-Mulden-Mikrotiterplatten, die mit 0,1 % Gelatine beschichtet wurden und in die je 1,5 ml pro Mulde Differenzierungsmedium vorgelegt wurde und die anschließend mit je 4 Organoid Bodies beschickt wurden.

- 5 In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens wurden OBs etwa 7 Wochen lang in den gelatine-beschichteten 6-cm-Petrischalen kultiviert und danach wurden einzelne OBs mit dem Microdissector (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers ausgeschnitten und dann z.B. auf frische 6-cm-Petrischalen, Chamber Slides oder Thermanox-Platten überführt.

10

BEISPIEL 6

- Zur Isolierung und Kultivierung von humanen adulten Stammzellen wurde humanes Gewebe von erwachsenen Patienten unmittelbar nach einem chirurgischen Eingriff erhalten und sofort aufgearbeitet. Aus dem chirurgisch entfernten Gewebe, z.B. Pankreas- oder
15 Speicheldrüsengewebe, wurde gesundes Gewebe abgetrennt und in Digestionsmedium aufgenommen. Dieses Gewebe wurde dann analog dem für die Ratte beschriebenen Protokoll aufgearbeitet und die Stammzellen in analoger Weise isoliert und kultiviert.

- Falls die Stammzellen später für therapeutische Zwecke genutzt werden sollen, sind aus
20 Sicherheitsgründen noch verschiedene Bedingungen zu erfüllen, um eine Gefährdung des zu behandelnden Patienten auszuschließen, insbesondere:

- Verwendung von humanem Serum, vorzugsweise Eigenplasma des Patienten, an Stelle von FKS, erforderlichenfalls Aufreinigung des Serums bzw. Plasmas
- Ausschluss jeder tierischen Quelle von weiteren Medienzusätzen
- 25 - höchste Reinheit aller Substanzen, Sterilität von Geräten und Umgebung
- Sterilität und Reinheit der Stammzellkultur durch mehrmaliges Passagieren der Stammzellen und Kontrolle auf Kontamination durch Mycoplasmen oder andere Mikroorganismen
- sorgfältige Überprüfung des Ausgangsgewebes und der Stammzellen auf Tumorgenizität.

30

BEISPIEL 7

Charakterisierung differenzierter Zellen

1. Immunohistochemie

- Organoid Bodies, die mindestens 3 Wochen lang auf Chamber Slides kultiviert worden
- 5 waren, sowie Querschnitte von "Langzeit"-OBs wurden zweimal in PBS gespült, fünf Minuten lang mit Methanol:Aceton (7:3), enthaltend 1 g/ml DAPI (Roche, Schweiz) bei -20°C fixiert und dreimal in PBS gewaschen. Nach Inkubation in 10%igem normalem Ziegen Serum bei Raumtemperatur für 15 Minuten wurden die Proben über Nacht mit primären Antikörpern bei 4°C in einer Befeuchtungskammer inkubiert. Die primären
- 10 Antikörper waren gegen das Proteingenprodukt 9.5 (PGP 9.5, polyklonaler Kaninchenantikörper, 1:400, Ultraclean, Insel Wight), Neurofilamente (NF-Pan-Cocktail, polyklonaler Kaninchenantikörper, 1:200, Biotrend, Deutschland), α -Smooth-muscle-actin (α -SMA, monoklonaler Mausantikörper, 1:100, DAKO, Dänemark), gliales fibrilläres saures Protein (GFAP, monoklonaler Mausantikörper, 1:100, DAKO, Dänemark),
- 15 Kollagen II (monoklonaler Mausantikörper II-II-6B3, 1:20, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA), Vigilin FP3 (1:200, Kügler et al., 1996), Cytokeratine (Pan Cytokeratin, monoklonaler Mausantikörper, 1:100, Sigma, USA), Alpha-Amylase (polyklonaler Kaninchenantikörper, 1:100, Calbiochem, Deutschland) und Insulin (monoklonaler Mausantikörper, 0,5 g/ml, Dianova, Deutschland) gerichtet. Nach
- 20 dreimaligem Spülen mit PBS wurden Objektträger 45 Minuten lang bei 37°C mit entweder Cy3-markiertem Antimäus-IgG oder FITC-markiertem Antikaninchen-IgG (Dianova), beide 1:200 verdünnt, inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal in PBS gewaschen, mit Vectashield Mounting Medium (Vector, USA) beschichtet und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiosop Zeiss, Deutschland) oder mit einem konfokalen
- 25 Laserscanningmikroskop (LSM 510 Zeiss, Deutschland) analysiert. Eine Alcianblaufärbung wurde mittels Standardverfahren durchgeführt.

2. Transmissionselektronenmikroskopie

- OBs wurden auf Thermanox-Platten (Nalge Nunc International, USA) mindestens 3
- 30 Wochen lang kultiviert. An den Thermanox-Platten haftende Proben wurden durch Eintauchen in 0,1 M Cacodylat-Puffer, enthaltend 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % Paraformaldehyd, bei pH 7,4 24 h lang inkubiert. Nach einer Nachfixierung in 1% OsO₄, "en bloc"-Anfärbung mit 2% Uranylacetat und Dehydrierung in reinen Alkoholen wurden die

Proben in Araldite eingebettet. Nach Entfernung der Thermanox-Platte wurden Semithin-Schnitte entweder tangential oder senkrecht zur eingebetteten Zellkultur vorgenommen und mit Methylenblau und Azur II geschnitten. Ultradünne Schnitte wurden aus den Regionen von Interesse ausgeschnitten, mit Bleicitrat angefärbt und unter einem Transmissions-

5 elektronenmikroskop (Phillips, EM 109) untersucht.

PATENTANSPRÜCHE

1. Isolierte pluripotente adulte Stammzellen, welche aus exokrinem Drüsengewebe erhalten wurden.
2. Pluripotente adulte Stammzellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das exokrine Drüsengewebe von einem Wirbeltier, vorzugsweise einem Säuger, stammt.
3. Pluripotente adulte Stammzellen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das exokrine Drüsengewebe von einem Primaten, insbesondere einem Menschen, stammt.
4. Pluripotente adulte Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass das exokrine Drüsengewebe aus einer Speicheldrüse, Tränendrüse, Schweißdrüse, Talgdrüse oder aus gastro-intestinalem Gewebe, einschließlich Pankreas, stammt.
5. Pluripotente adulte Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass das exokrine Drüsengewebe acinäres Gewebe ist.
6. Pluripotente adulte Stammzellen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das acinäre Gewebe aus dem Pankreas, der Ohrspeicheldrüse oder Unterkieferspeicheldrüse stammt.
7. Pluripotente adulte Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass sie das Vermögen zur Bildung von organoiden Körpern aufweisen.
8. Pluripotente adulte Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass sie in der Lage sind, nach Kultivierung unter räumlichen Bedingungen, welche für einen dreidimensionalen Kontakt der Zellen sorgen, in

einem Kultivierungsmedium, das keine zusätzlichen Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren enthält, in Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren.

9. Pluripotente adulte Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen auch nach dem Einfrieren/Kryokonservieren ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und uneingeschränkten Teilung behalten und nicht differenzieren.
10. Stammzellkultur, umfassend die Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 in einem Kulturmedium, welches die stabile Aufrechterhaltung und Vermehrung der Zellen im wesentlichen ohne Differenzierung erlaubt.
11. Stammzellkultur nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Kulturmedium keine Feederzellschicht umfasst.
12. Stammzellkultur nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen für mehr als 25 Passagen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und uneingeschränkten Teilung behalten.
13. Stammzellkultur nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen für mehr als 50, vorzugsweise mehr als 100, Passagen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und uneingeschränkten Teilung behalten.
14. Aus exokrinem Drüsengewebe erhaltene primäre Stammzellkultur, dadurch gekennzeichnet, dass die Mehrzahl der in der Kultur vorliegenden lebenden Zellen undifferenzierte pluripotente adulte Stammzellen sind.
15. Organoide Körper, gebildet von den Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 und erhältlich durch Kultivierung dieser Stammzellen unter räumlichen Bedingungen, welche für einen dreidimensionalen Kontakt der Zellen sorgen.

16. Organoide Körper nach Anspruch 15, erhältlich durch Kultivierung der Stammzellen in hängenden Tropfen, bewegter Suspensionskultur oder Oberflächenkultur auf Oberflächen, an denen die Zellen nicht oder schlecht haften.
17. Organoide Körper nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen dieser organoiden Körper nach dem Einfrieren/Kryokonservieren ihre Lebensfähigkeit und ihr Differenzierungsvermögen im wesentlichen behalten.
18. Sekundäre organoide Körper, erhältlich aus den organoiden Körpern nach einem der Ansprüche 15-17 durch spontanes Wachstum in Oberflächenkultur auf Oberflächen ohne eingeschränkte Oberflächenadhäsion.
19. Verfahren zur Herstellung adulter pluripotenter Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass exokrines Drüsengewebe entnommen,
das entnommene Gewebe zerkleinert,
das zerkleinerte Gewebe kultiviert und
die in Kultur persistierenden Zellen kultiviert werden.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass
das Gewebe so schonend zerkleinert wird, dass die Zellverbände in den resultierenden Gewebestückchen weitgehend erhalten bleiben, und
das zerkleinerte Gewebe zunächst unter geeigneten Bedingungen in Gewebekulturgefäßen kultiviert wird, wobei der Großteil der differenzierten Zellen schnell im Verlauf weniger Tage abstirbt und sich von den Stammzellen löst, wonach die Stammzellen sich am Boden der Gewebekulturgefäße festsetzen,
und das restliche Gewebe und nicht-adhärenz differenzierte Zellen durch einen ersten Mediumwechsel weitgehend abgetrennt werden, und
durch weitere Mediumwechsel in Abständen von wenigen Tagen, vorzugsweise etwa 2-3 Tagen, restliche nicht-adhärenz Zellen abgetrennt werden.
21. Verfahren zur Herstellung differenzierter Zellen aus den Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die undifferenzierten Stammzellen unter räumlichen Bedingungen, welche für einen dreidimensionalen Kontakt der

Zellen sorgen, weiter kultiviert werden, bis sich organoide Körper bilden, die in Suspensionskultur übertragen und dort weiter kultiviert werden.

22. Verfahren zur Herstellung differenzierter Zellen aus den Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die undifferenzierten Stammzellen in ein Differenzierungsmedium überführt und unter räumlichen Bedingungen, welche für einen dreidimensionalen Kontakt der Zellen sorgen, weiter kultiviert werden, bis sich organoide Körper bilden, welche in Oberflächenkultur überführt werden, wonach sich in der Oberflächenkultur aus auswachsenden einzelnen Zellen dieser organoiden Körper spontan sekundäre organoide Körper, welche dieselben Eigenschaften wie die primären organoiden Körper aufweisen, bilden, die dann weiter kultiviert werden können.
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung unter räumlichen Bedingungen, welche für einen dreidimensionalen Kontakt der Zellen sorgen, die Kultivierung in hängenden Tropfen, bewegter Suspensionskultur oder die Oberflächenkultur auf Oberflächen, an denen die Zellen nicht oder schlecht haften, ist.
24. Differenzierte Zellen, erhältlich aus den Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 21-23.
25. Differenzierte Zellen nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Knochenzellen, z.B. Osteoblasten, Osteoclasten, Chondrozyten, Adipozyten, Fibroblasten, z.B. Haut- und Sehnenfibroblasten, Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, hematopoetische Zellen, sensorische Zellen, endokrine und exokrine Drüsenzellen, Gliazellen, neuronale Zellen, Oligodendrozyten, Blutzellen, Darmzellen, Herz-, Lungen-, Leber-, Nieren- oder Pankreaszellen handelt.
26. Differenzierungskultur, umfassend die differenzierten Zellen nach einem der Ansprüche 24-25 und/oder die organoiden Körper nach einem der Ansprüche 15-18 in einem Differenzierungsmedium.

27. Differenzierungskultur nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungsmedium keine zusätzlichen Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren umfasst.
28. Verfahren zur Behandlung einer Verletzung oder eines Krankheitszustands, umfassend die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 oder der differenzierten Zellen nach einem der Ansprüche 24-25 an ein Individuum oder das extrakorporale Kontaktieren der Stammzellen oder davon abgeleiteten differenzierten Zellen mit einer Körperflüssigkeit des Individuums und die anschließende Rückführung der Körperflüssigkeit in das Individuum.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Stammzellen von autologem Gewebe des Individuums stammen.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Stammzellen in den Körper des Individuums eingebracht werden und dort *in vivo* differenzieren, um die Funktion eines fehlenden oder geschädigten Organs, Gewebetyps oder Zelltyps zu übernehmen.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-30, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung das Immunsystem des Individuums wiederherstellt oder stärkt.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-31, dadurch gekennzeichnet, dass die Stammzellen als Vehikel für ein therapeutisches Agens dienen.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass das therapeutische Agens DNA, RNA, ein Protein, Peptid oder ein niedermolekularer Arzneiwirkstoff ist.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-33, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein gentherapeutisches Verfahren handelt.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-34, dadurch gekennzeichnet, dass die Stammzellen gentechnisch manipuliert wurden, um bestimmte Eigenschaften aufzuweisen.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-35, dadurch gekennzeichnet, dass die Stammzellen zusammen mit einer physiologisch annehmbaren Matrix oder einem physiologisch annehmbaren Träger verabreicht werden.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-36, dadurch gekennzeichnet, dass die Verabreichung der Stammzellen mittels lokaler Injektion, systemischer Injektion, parenteraler Verabreichung, oraler Verabreichung oder intrauteriner Injektion in einen Embryo erfolgt.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-37, dadurch gekennzeichnet, dass der zu behandelnde Krankheitszustand ein Tumor, eine Lebererkrankung, eine Bindegewebserkrankung, eine kardiovaskuläre Erkrankung, neurodegenerative Erkrankung, metabolische Erkrankung, Autoimmunerkrankung, Anämie, Hämophilie, Diabetes, Ischämie, eine Entzündung, Infektionskrankheit, ein Alterungsprozeß, genetischer Defekt oder Transplantat-Abstoßung ist.
39. Verwendung der Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, Stammzellkulturen nach einem der Ansprüche 10-13 oder der organoiden Körper nach einem der Ansprüche 15-18 oder daraus erhaltener differenzierter Zellen zur Entwicklung gewebeähnlicher oder organähnlicher multizellulärer Systeme *in vitro*.
40. Verwendung nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß die multizellulären Systeme mehrere Arten von Zellen umfassen.
41. Verwendung der Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 oder daraus erhaltener differenzierter Zellen für das reproduktive Klonen eines nicht-humanen Organismus.
42. Verwendung der Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9, Stammzellkulturen nach einem der Ansprüche 10-13 oder der organoiden Körper nach einem der

Ansprüche 15-18 oder daraus erhaltener differenzierter Zellen als *in vitro*-System zum Testen von Chemikalien, insbesondere zum Screenen von Arzneiwirkstoffen.

43. Verwendung der differenzierten Zellen nach Anspruch 24-25 oder der Differenzierungskultur nach Anspruch 26-27 oder daraus erhaltener multizellulärer Systeme zur Produktion gewünschter Substanzen *in vitro*.
44. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 oder daraus erhaltene differenzierte Zellen sowie eine physiologisch annehmbare Matrix oder einen physiologisch annehmbaren Träger.
45. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 44, umfassend ferner weitere Hilfsstoffe oder Wirkstoffe.
46. Kit, umfassend die Stammzellen nach einem der Ansprüche 1-9 oder die daraus erhaltenen differenzierten Zellen oder die pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 44 oder 45.
47. Kit nach Anspruch 46, umfassend weitere Hilfsmittel oder Reagenzien, z.B. Reagenzien zur Kultivierung der Zellen oder diagnostische Reagenzien.

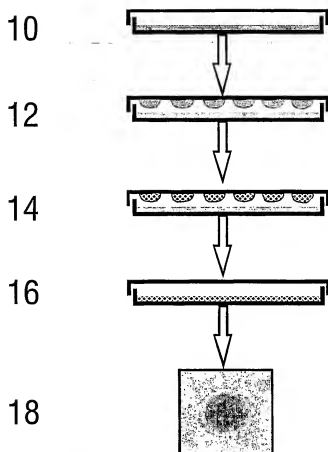


FIG. 1

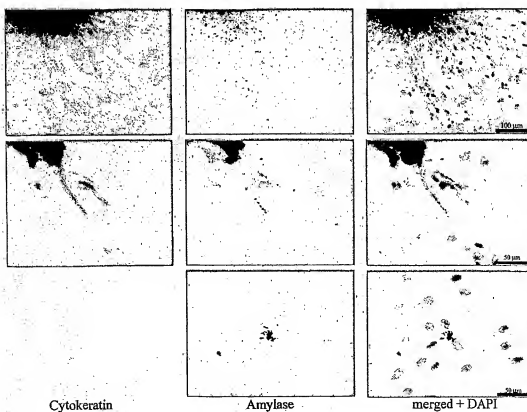


FIG. 2

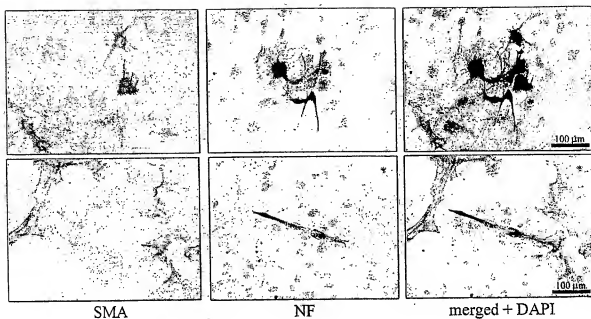


FIG. 3



FIG. 4

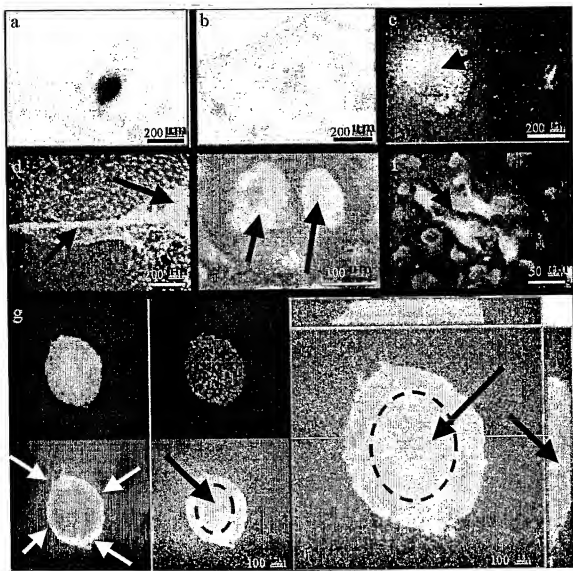


FIG. 5

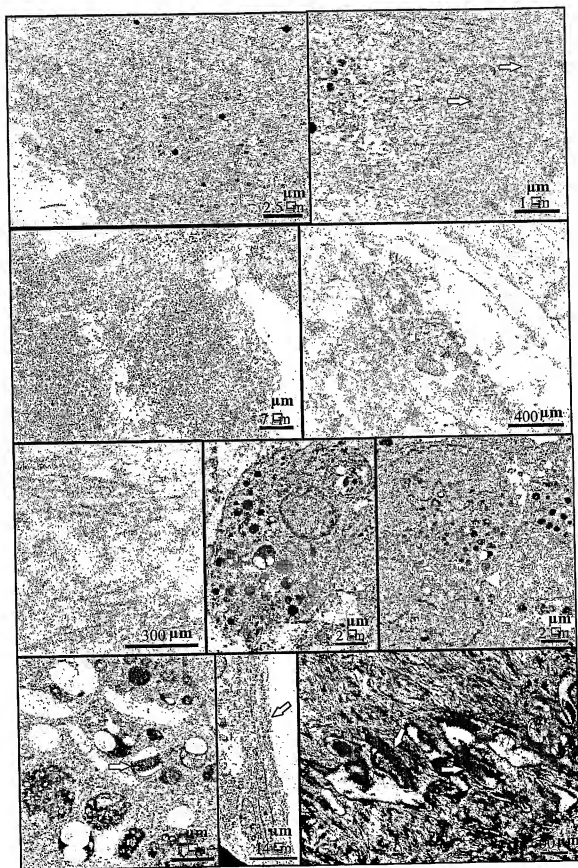


FIG. 6

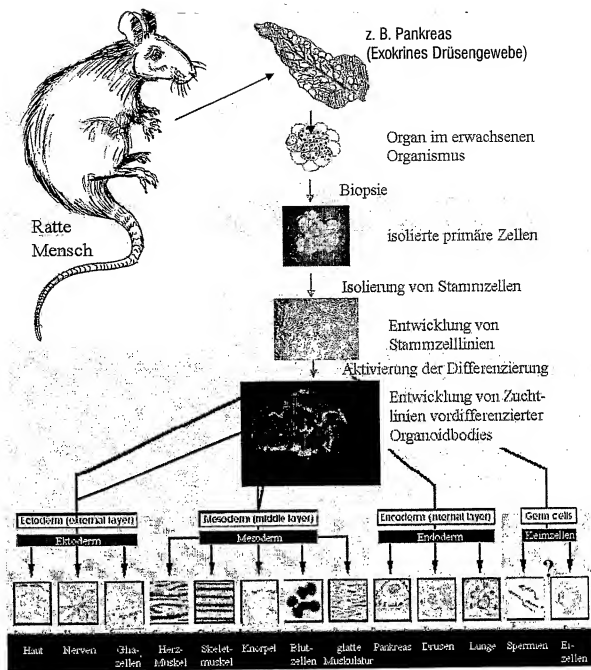


FIG. 7

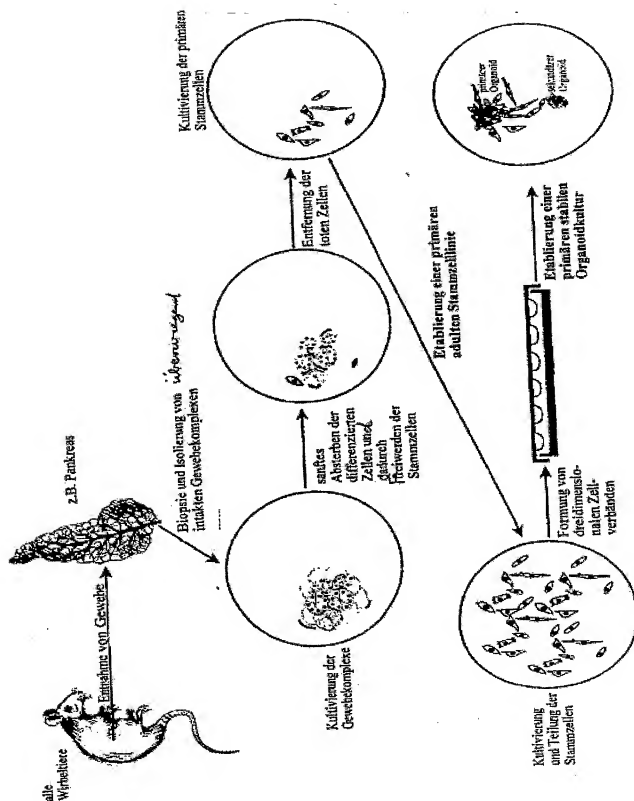
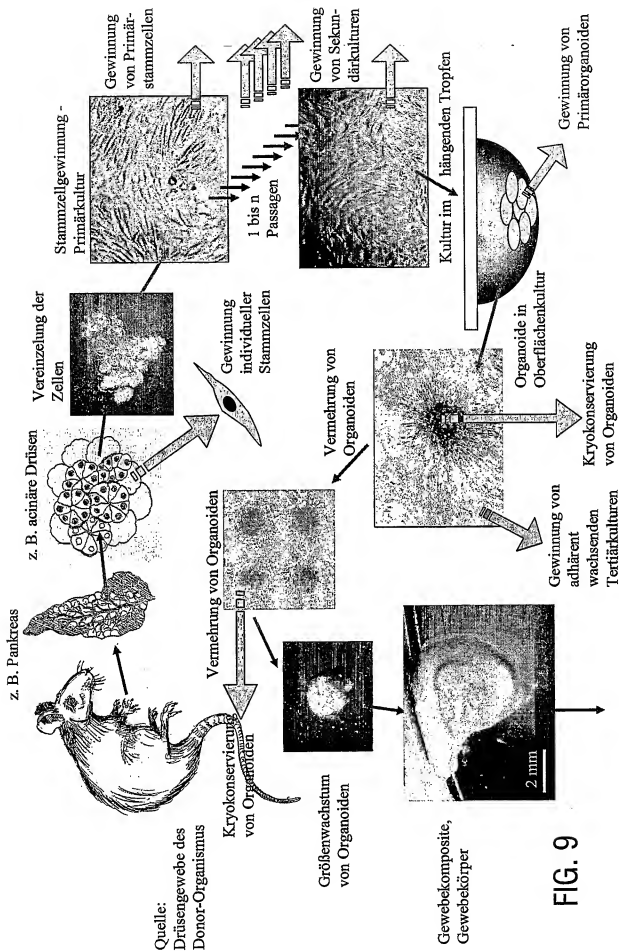


FIG. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/003810

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/06 A61K35/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/78929 A (BONNER WEIR SUSAN ; TANEJA MONICA (US); JOSLIN DIABETES CT INC (US)) 28 December 2000 (2000-12-28) page 19, line 17 - line 21 page 34, line 10 - line 11	1-6, 19, 21, 24, 25
X	BONNER-WEIR ET AL: "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 97, no. 14, 5 July 2000 (2000-07-05), pages 7999-8004, XP002144480 ISSN: 0027-8424 page 8003, left-hand column, line 12 - line 13 ----- -/-	1-6, 19, 21, 24, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

28 July 2004

04/08/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5016 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nichogiannopoulou, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/003810

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GMJR V ET AL: "HUMAN PANCREATIC DUCTAL CELLS: LARGE-SCALE ISOLATION AND EXPANSION" CELL TRANSPLANTATION, ELSEVIER SCIENCE, US, vol. 10, no. 1, 2001, pages 109-121, XP001010271 ISSN: 0963-6897 figure 1</p> <p>-----</p>	1

Although claims 19, 20 and 28-38 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/003810

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0078929	A	28-12-2000	
		AU 5632600 A	09-01-2001
		CA 2375509 A1	28-12-2000
		EP 1185622 A1	13-03-2002
		WO 0078929 A1	28-12-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/003810A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/06 A61K35/39

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/78929 A (BONNER WEIR SUSAN ; TANEJA MONICA (US); JOSLIN DIABETES CT INC (US)) 28. Dezember 2000 (2000-12-28) Seite 19, Zeile 17 - Zeile 21 Seite 34, Zeile 10 - Zeile 11	1-6,19, 21,24,25
X	BONNER-WEIR ET AL: "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 97, Nr. 14, 5. Juli 2000 (2000-07-05), Seiten 7999-8004, XP002144480 ISSN: 0027-8424 Seite 8003, linke Spalte, Zeile 12 - Zeile 13	1-6,19, 21,24,25
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

C Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

*** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juli 2004

Absenderdatum des internationalen Recherchenberichts

04/08/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nichogiannopoulou, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GMYR V ET AL: "HUMAN PANCREATIC DUCTAL CELLS: LARGE-SCALE ISOLATION AND EXPANSION" CELL TRANSPLANTATION, ELSEVIER SCIENCE, US, Bd. 10, Nr. 1, 2001, Seiten 109-121, XP001010271 ISSN: 0963-6897 Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 19, 20 und 28-38 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 5.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP2004/003810

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0078929 A	28-12-2000	AU 5632600 A	09-01-2001
		CA 2375509 A1	28-12-2000
		EP 1185622 A1	13-03-2002
		WO 0078929 A1	28-12-2000